

ASPARAGINE-BOUND TYPE SACCHARIDE DERIVATIVE AND ITS PRODUCTION

Patent number: JP7224082
Publication date: 1995-08-22
Inventor: MATSUO ICHIRO; AJISAKA KATSUMI;
OGAWA TOMOYA
Applicant: RIKAGAKU KENKYUSHO;; MEIJI MILK
PROD CO LTD
Classification:
- **international:** C07H5/04; C07H15/12; C07H3/06
- **european:**
Application number: JP19940017443 19940214
Priority number(s): JP19940017443 19940214

Report a data error here

Abstract of JP7224082

PURPOSE:To obtain a new derivative useful as e.g. an intermediate for the raw materials for proteinic medicines such as glycopeptides or conjugate-type glycoasparagines, by reaction of a pentoglycosyl azide with aspartic anhydride, etc., in the presence of a catalytic hydrogenation reducing catalyst followed by deprotection. **CONSTITUTION:**A pentoglycosyl azide of formula I [R<3a> and R<4a> each is H or a protecting group for hydroxyl group eliminable under neutral condition; R<3> is H, an acyl or a protecting group for hydroxyl group eliminable under neutral condition; X is a (protected) amino group] is reacted with an aspartic anhydride or active ester of formula II (R<1a> is a protecting group for alpha-amino group; R<2a> is a protecting group for carboxyl group) in the presence of a catalytic hydrogenation reducing catalyst to obtain the aimed asparagine-bound type saccharide derivative of formula III (R<1> is H or a protecting group for a-amino group; R<2> is H or a protecting group for carboxyl group) useful as an intermediate for the raw materials for proteinic medicines such as various glycopeptides, glycoproteins and conjugate-type glycoasparagines, or as a function modifier for glycoprotein sugar chains.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-224082

(43)公開日 平成7年(1995)8月22日

(51)Int.Cl.⁹

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 0 7 H 15/12

3/06

5/04

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 21 頁)

(21)出願番号 特願平6-17443

(22)出願日 平成6年(1994)2月14日

(71)出願人 000006792

理化学研究所

埼玉県和光市広沢2番1号

(71)出願人 000006138

明治乳業株式会社

東京都中央区京橋2丁目3番6号

(72)発明者 松尾 一郎

神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業
株式会社ヘルスサイエンス研究所内

(72)発明者 鯉坂 勝美

神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業
株式会社ヘルスサイエンス研究所内

(74)代理人 弁理士 有賀 三幸 (外3名)

最終頁に続く

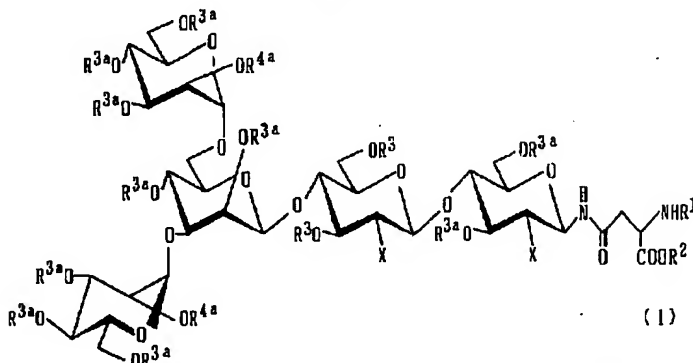
(54)【発明の名称】 アスパラギン結合型糖誘導体及びその製法

(57)【要約】

【構成】 一般式(1)

* 【化1】

*



【式中、R¹ は水素原子又はα-アミノ基の保護基を示し、R² は水素原子又はカルボキシル基の保護基を示し、R^{3a} 及びR^{4a} は同一又は異なって水素原子又は中性条件下で脱離可能な基を示し、Xは保護されていてもよいアミノ基を示す】で表わされるアスパラギン結合型糖誘導体、その中間体及びそれらの製造法。

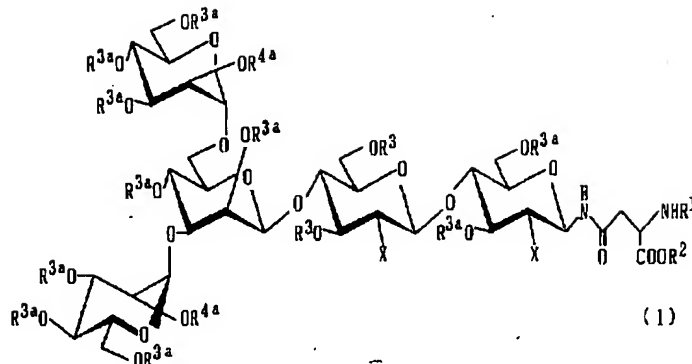
【効果】 この化合物(1)は、どのような構造のアスパラギン結合型糖鎖の合成にも対応できるのみならず、不溶性の樹脂上でペプチド鎖を伸長させていくペプチド固相合成法に組み入れ、更に大きな糖ペプチドにすることも容易である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式(1)

* 【化1】

*

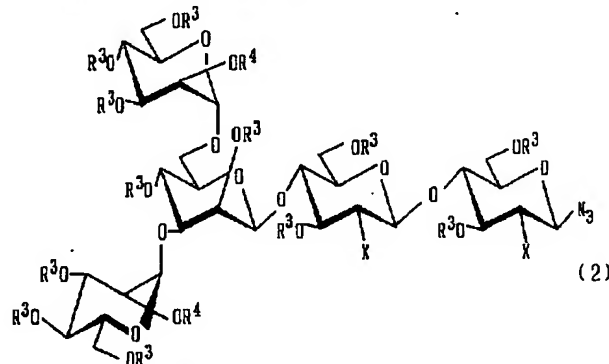


〔式中、 R^1 は水素原子又は α -アミノ基の保護基を示し、 R^2 は水素原子又はカルボキシル基の保護基を示し、 R^{3a} 及び R^{4a} は同一又は異なって水素原子又は中性条件下で脱離可能な水酸基の保護基を示し、 X は保護さ※

※れていてもよいアミノ基を示す〕で表わされるアスパラギン結合型糖誘導体。

【請求項2】 一般式(2)

【化2】

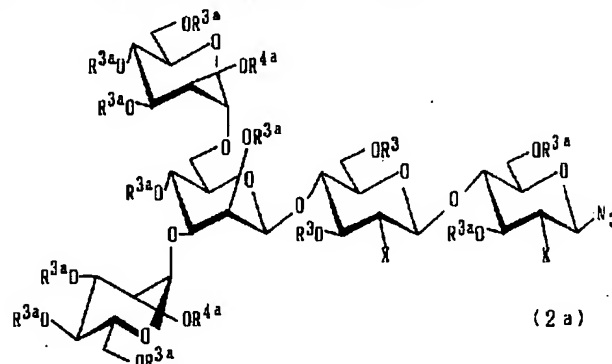


〔式中、 R^3 及び R^4 は同一又は異なって水素原子、アシル基又は中性条件下で脱離可能な水酸基の保護基を示し、 X は保護されていてもよいアミノ基を示す〕で表わ★

★される五糖グリコシルアジド。

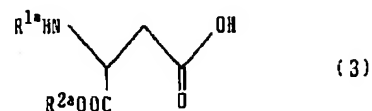
【請求項3】 一般式(2a)

【化3】



〔式中、 R^{3a} 及び R^{4a} は同一又は異なって水素原子又は中性条件下で脱離可能な水酸基の保護基を示し、 X は保護されていてもよいアミノ基を示す〕で表わされる五糖グリコシルアジドに、一般式(3)

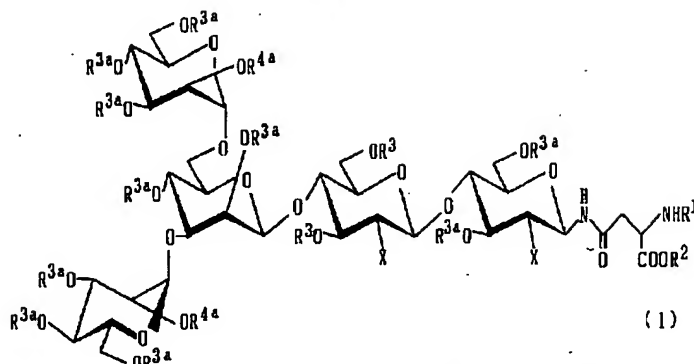
【化4】



〔式中、 R^{1a} は α -アミノ基の保護基を示し、 R^{2a} はカルボキシル基の保護基を示す〕で表わされるアスパラギン酸の無水物又は活性エステルを接触水素化還元触媒の存在下に反応させ、所望により R^{1a} 、 R^{2a} 、 R^{3a} 及び R

1'の保護基を脱離せしめることを特徴とする一般式
(1)

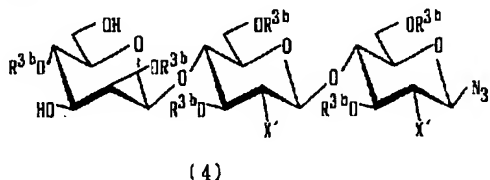
* 【化5】



〔式中、R¹ は水素原子又はα-アミノ基の保護基を示し、R² は水素原子又はカルボキシル基の保護基を示し、R^{3a} 及びR^{4a} は同一又は異なって水素原子又は中性条件下で脱離可能な水酸基の保護基を示し、Xは保護されていてもよいアミノ基を示す〕で表わされるアスパラギン結合型糖誘導体の製造法。

【請求項4】 一般式(4)

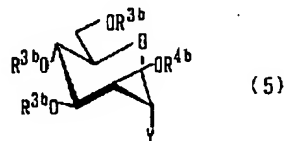
【化6】



〔式中、R^{3b} は同一又は異なってアシル基又は中性条件※

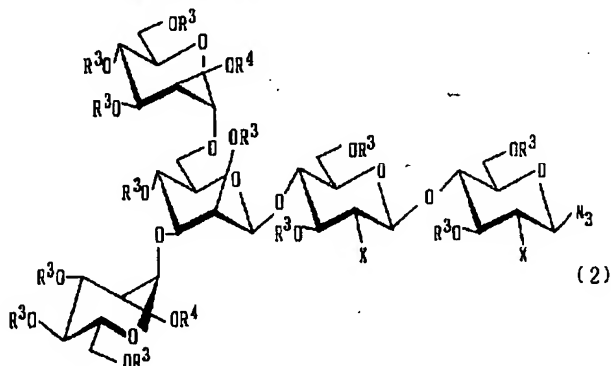
※下で脱離可能な水酸基の保護基を示し、X¹ は保護されたアミノ基を示す〕で表わされる三糖グリコシルアジドに、一般式(5)

【化7】



〔式中、R^{3b} 及びR^{4b} は同一又は異なってアシル基又は中性条件下で脱離可能な水酸基の保護基を示し、Yはハロゲン原子を示す〕で表わされる単糖類を反応させ、所望により保護基を脱離せしめることを特徴とする一般式(2)

【化8】



〔式中、R³ 及びR⁴ は同一又は異なって水素原子、アシル基又は中性条件下で脱離可能な水酸基の保護基を示し、Xは保護されていてもよいアミノ基を示す〕で表わされる五糖グリコシルアジドの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は種々の糖ペプチド、糖蛋白質及び複合型糖アスパラギン等の合成中間体として有用なアスパラギン結合型糖誘導体、五糖グリコシルアジド及びそれらの製造法に関する。

【0002】

40 【従来の技術】 アスパラギン結合型糖鎖は、高マンノース型、複合型及び混成型に分類されるが、これらはどれもManα1→6 (Manα1→3) Manβ1→4GlcNAcβ1→4GlcNAcで示される共通の五糖母核構造を持っている。この五糖の還元末端のN-アセチルグルコサミン残基と、L-アスパラギンあるいはポリペプチド鎖上のアスパラギン残基とが、β-N-グリコシド結合したアスパラギン結合型糖誘導体は、蛋白性医薬品原料の中間体として、あるいは糖蛋白質糖鎖の機能改変材料として極めて有用である。

50 【0003】 しかしながら、これまでに化学合成された

アスパラギン結合型糖誘導体の糖鎖部分は、水酸基がアセチル基で保護された単糖若しくは二、三糖 [Gunther, W. and Kunz, H. (1990) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29, 1050-1051] であり、四糖以上については、羊の尿由来の天然オリゴ糖 (七糖) の報告 [Nakabayashi, S., Warren, C. D. and Jeanloz, R. W. (1988) *Carbohydr. Res.* 174, 279-289] が唯一である。

【0004】通常アスパラギン結合型糖誘導体を化学合成する場合、N-アセチルグルコサミン残基のC-1位にアジド基を導入した後、これを還元してグリコシルアミンとし、次いでアスパラギン酸あるいはペプチド鎖上のアスパラギン酸残基にカルボジイミドなどの縮合剤を用いて、 β -N-グリコシド結合させる。しかしながら、アジド基を導入してグルコシルアジドに変換する方法は、単糖以外では殆どなく一般性がない。

【0005】また、糖の水酸基の保護基には、通常アセチル基やベンゾイル基などのアシル系の保護基が用いられているが、アシル系保護基の脱保護は塩基性条件下で行う必要があり、糖鎖に結合したアミノ酸のラセミ化が避けられないという問題があった。

【0006】一方、糖の水酸基の保護基として中性条件下で容易に脱離できるベンジル基を用いた五糖がポールセンらによって報告されている [Paulsen, H. and Leubner, R. (1984) *Carbohydr. Res.* 130, 85-101] が、この五糖はN-アセチルグルコサミン残基のC-1位がベンジル保護されていることから直接アスパラギン酸を導入することができない。

* 【0007】

【発明が解決しようとする課題】このように従来、アスパラギン結合型糖鎖の母核であるアスパラギン結合型五糖は未だ合成されていない。従って、本発明の目的は種々のアスパラギン結合型糖鎖合成の中間体として有用なアスパラギン結合型五糖類及びその製造法を提供することにある。また、本発明は当該アスパラギン結合型五糖類の合成中間体、更には種々の糖類の合成中間体として有用な五糖グリコシルアジド及びその製造法を提供することにある。

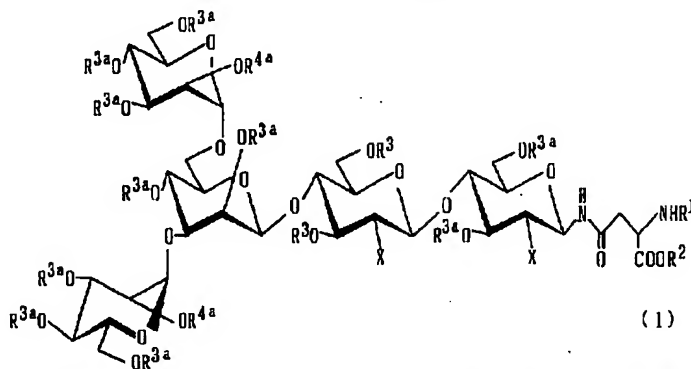
【0008】

【課題を解決するための手段】そこで、本発明者らは、糖鎖部分の合成方法及び得られた糖鎖とアスパラギン酸あるいはペプチド上のアスパラギン残基との結合反応について種々検討した結果、糖鎖部分の水酸基の保護基の選択、糖の1位へのアジド基の導入方法、アジド基の導入された糖を受容体として非還元末端に糖を伸長する方法、及び得られたグリコシルアジドを還元してグリコシルアミンとした後、これを単離することなくアスパラギン酸無水物又は活性エステルと β -N-グリコシド結合させる方法を開発した。これらの方法を利用することにより、目的とする五糖グリコシルアジド及びアスパラギン結合型糖誘導体が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】すなわち、本発明は次の一般式 (1)

【0010】

* 【化9】



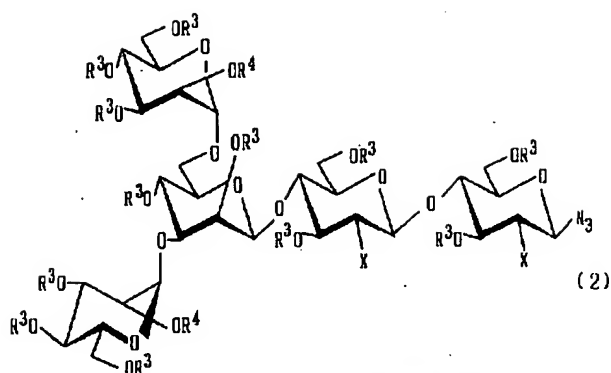
【0011】〔式中、 R^1 は水素原子又は α -アミノ基の保護基を示し、 R^2 は水素原子又はカルボキシル基の保護基を示し、 R^{3a} 及び R^{4a} は同一又は異なって水素原子又は中性条件下で脱離可能な水酸基の保護基を示し、Xは保護されていてもよいアミノ基を示す〕で表わされ

るアスパラギン結合型糖誘導体及びその製造法に係るものである。

【0012】また、本発明は次の一般式 (2)

【0013】

【化10】



【0014】〔式中、 R^3 及び R^4 は同一又は異なって水素原子、アシル基又は中性条件下で脱離可能な水酸基の保護基を示し、 X は保護されていてもよいアミノ基を示す〕で表わされる五糖グリコシルアジド及びその製造法に係るものである。

【0015】本発明において、 α -アミノ基の保護基としては、通常ペプチド合成の際に利用される α -アミノ基の保護基であれば特に制限されないが、ウレタン型保護基、アシル型保護基、アルキル型保護基、チオエーテル型保護基、イミノ型保護基等が挙げられる。ここで、ウレタン型保護基としてはベンジルオキシカルボニル、置換ベンジルオキシカルボニル、フルオレニルメトキシカルボニル等のアラルキルオキシカルボニル基； t -ブトキシカルボニルに代表されるアルキルオキシカルボニル基；トリフェニルホスフィノエチルオキシカルボニル、メチルスルフェニルエチルオキシカルボニル等の置換アルキルオキシカルボニル基；アリルオキシカルボニルに代表されるアルケニルオキシカルボニル基；フェノキシカルボニル等のアリールオキシカルボニル基等が挙げられる。アシル型保護基としては、アセチル基等のアルカノイル基； o -ニトロフェニルチオアセチル基等のアリールチオアセチル基等が挙げられる。アルキル型保護基としてはベンジル、ベンズヒドリル、トリフェニルメチル基等のアラルキル基が挙げられる。チオエーテル型保護基としては、トリフェニルメチルチオ、ジニトロフェニルチオ、トリクロロフェニルチオ等のアラルキルチオ基又は置換フェニルチオ基が挙げられる。また、イミノ型保護基としては、置換ベンジリデン基等が挙げられる。これらの α -アミノ基の保護基のうち、ウレタン

型保護基が特に好ましい。

【0016】カルボキシ基の保護基としては、通常ペプチド合成の際に利用されるカルボキシ基保護基であれば特に制限されないが、メチル、エチル、 t -ブチル、アリル等のアルキル又はアルケニル基；ベンジル、置換ベンジル、2-トリフルオロメチル-6-クロモニルメチル、スルホベンジル、9-フルオレニルメチル等のアラルキル基；フェナシル、 p -メトキシフェナシル等のアリルカルボニルメチル基；カルバモイルメチル、メチルチオメチル、トリフェニルホスフィノエチル等の置換アルキル基等が挙げられる。これらのカルボキシ基のうちアラルキル基が特に好ましい。

【0017】中性条件下で脱離可能な水酸基の保護基としては、エーテル系保護基、エステル系保護基が挙げられる。当該エーテル系保護基としては、ベンジル基、 p -メトキシベンジル基、アリル基、有機シリル基、トリチル基等が挙げられる。エステル系保護基としてはアリルオキシカルボニル基等が挙げられる。

【0018】また、 X で示される基としては、前記 α -アミノ基の保護基で保護されたアミノ基と同じものがあげられるが、より好ましくは炭素数2~6のアルカノイルアミド、フタルイミド等が挙げられる。また、アシル基としては、前記アシル型保護基と同じものがあげられるが、炭素数2~6のアルカノイル基が特に好ましい。

【0019】本発明化合物(1)及び(2)は、例えば次に示す反応式に従って製造される。

【0020】

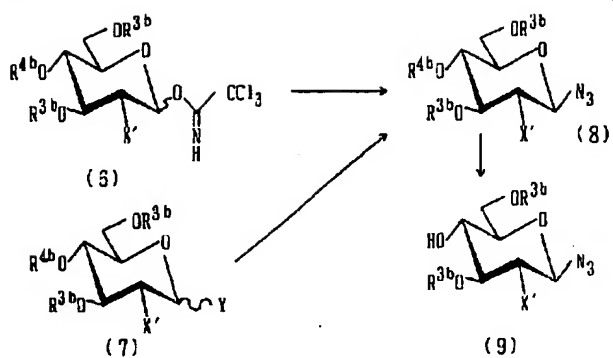
【化11】

(6)

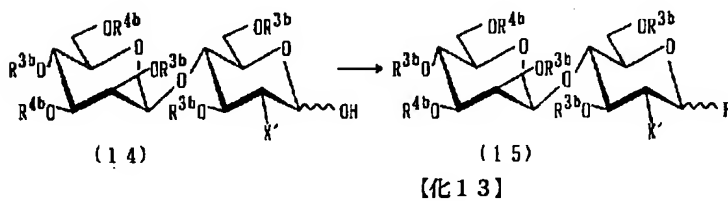
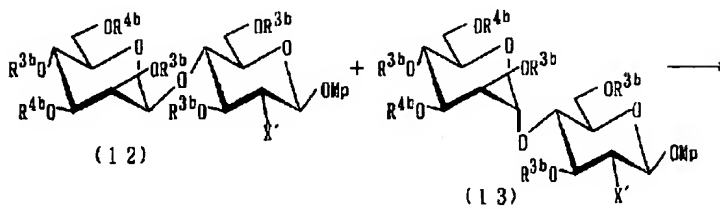
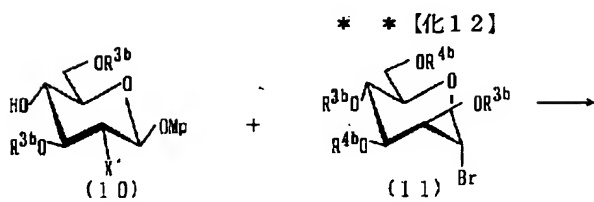
特開平7-224082

9

10

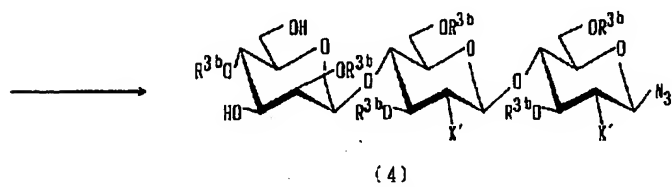
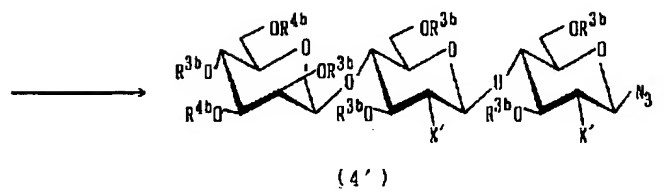
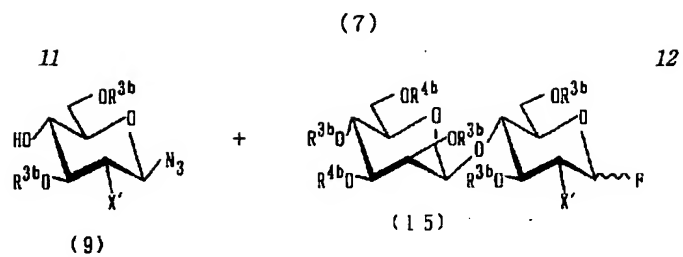


【0021】



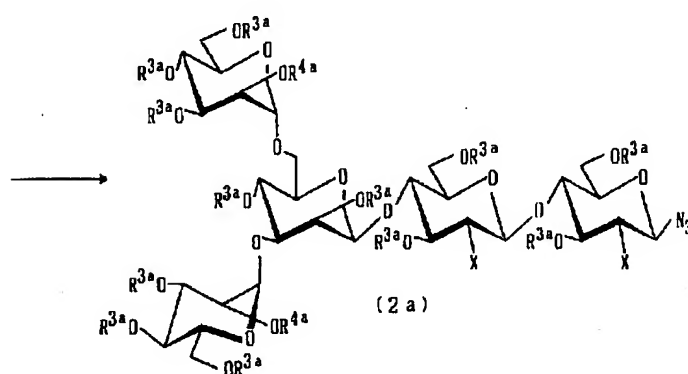
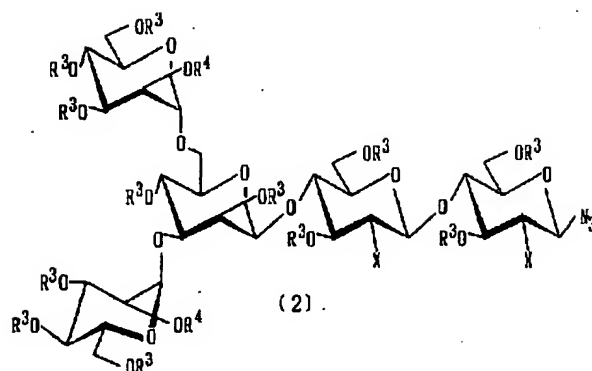
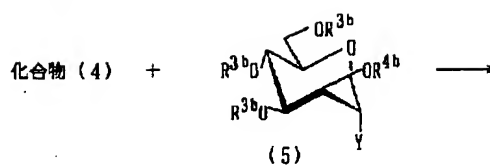
【0022】

【化13】



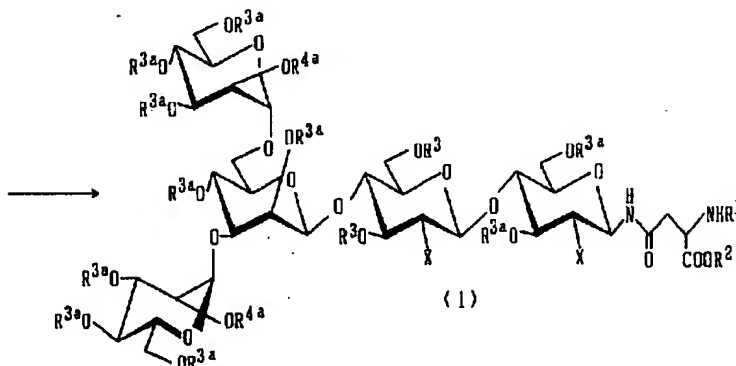
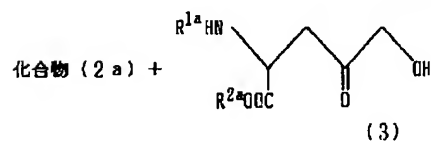
【0023】

【化14】



【0024】

* * 【化15】



【0025】〔式中、 R^{1a} は α -アミノ基の保護基を示し、 R^{2a} はカルボキシル基の保護基を示し、 R^{3b} 及び R^{3a} は同一又は異なってアシル基又は中性条件下で脱離可能な基を示し、 X' は保護アミノ基を示し、 Y はハロゲン

ン原子を示し、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 $R^{3'}$ 、 $R^{4'}$ 及びXは前記と同じ

【0026】(1) 式(6)で示されるトリクロロアセトイミデート体又は式(7)で示されるグリコシルハライドを、活性化剤 $BF_3 \cdot Et_2O$ 又は $Cp_2HfCl_2/AgClO_4$ の存在下、トリメチルシリルアジドで処理し、次いで $R^{4'}$ を脱保護して式(9)で示されるグリコシルアジドを得；

(2) このグリコシルアジド(糖受容体)に、式(15)で示される二糖性フルオリド(糖供与体)を、活性化剤の存在下 β -グリコシド結合させ、次いで $R^{4'}$ を脱保護して、式(4)で示される三糖性グリコシルアジドを得；

(3) この三糖性グリコシルアジド(糖受容体)に、式(5)で示される単糖類(糖供与体)を、活性化剤存在下 α -グリコシド結合させ、次いで所望により脱保護、アシル化して、式(2)及び(2a)で示される五糖性のグリコシルアジドを得；

(4) この五糖性グリコシルアジド(2a)と式(3)で示されるアスパラギン酸の無水物又は活性エステルとを接触水素化還元触媒の存在下に反応させ、所望により脱保護することにより、一般式(1)で示されるアスパラギン結合型糖誘導体を得る。

【0027】化合物(8)は、まず糖1位の水酸基以外の水酸基及びアミノ基が保護されたグルコサミンを一般的に用いられる糖供与体へと変換し、次いでこれらの糖供与体を $BF_3 \cdot Et_2O$ 又は $Cp_2HfCl_2/AgClO_4$ などの活性化剤の存在下トリメチルシリルアジド

($TMSN_3$)と反応させることにより得られる。即ち、保護グルコサミンにチオニクロライド、チオニプロマイド、三フッ化ジエチルアミノ硫酸(DAST)等のハロゲン化剤を反応させてグリコシルハライド(Cl 、 Br 、 F) (7)へ；又は1, 8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン(DBU)、水素化ナトリウム等の塩基の存在下、トリクロロアセトニトリルを反応させてトリクロロアセトイミデート体(6)へ変換する。糖1位へのアジド基の導入方法として、従来法では、爆発性のある AgN_3 などを用いていたため、特別の注意を要し、収率もよくなかった。それ故に、本発明では従来法を用いず、化合物(6)又は(7)と、トリメチルシリルアジドとをカップリングする方法を採用した。この方法により、糖1位にアジド基を持った化合物(8)を合成することができた。即ち化合物(6)又は(7)をできるだけ無水の有機溶媒に溶かし、要すれば冷却し、1~20倍モル、好ましくは5~12倍モルの $TMSN_3$ を加えた後、 $Cp_2HfCl_2/AgClO_4$ 、あるいは、 $BF_3 \cdot Et_2O$ 等のルイス酸の活性化剤を添加して反応を行う。30分~12時間で反応を終了し、常法により1N塩酸、飽和炭酸水素ナトリウムで洗浄して、乾燥後濃縮することにより化合物(8)を得

ることができる。

【0028】化合物(9)は、化合物(8)の $R^{4'}$ の保護基を脱保護することにより得られる。例えば $R^{4'}$ がアシル基の場合、一般的な脱アシル化の条件でアシル基を脱離して化合物(9)へと導くことができる。即ち、化合物(8)をできるだけ無水のテトラヒドロフラン(THF)、ジオキサン、あるいはアルコール類に溶解し、これに触媒量のナトリウムメチラート等のアルコキシド、あるいはトリエチルアミン等のアミン化合物を加えて反応を行う。反応温度は特に制限されないが、発熱する場合には冷却する。通常、0.5~1.2時間で脱アシル化された化合物(9)が得られる。

【0029】化合物(12)は、グルコース糖受容体(10)とマンノース糖供与体(11)とを、不溶性銀触媒の存在下反応させることにより得られる。即ち、糖受容体(10)をできるだけ無水の有機溶媒、例えば塩化メチレン、クロロホルム、四塩化炭素等の溶媒に溶解し、これに Ag -シリカアルミナ、 Ag -シリケート等の触媒、モレキュラーシーブス(MS)等の脱水剤を加える。これにできるだけ無水の溶媒に溶かした糖供与体(11)を加えて反応を行う。反応温度は、糖供与体(11)の添加時は0~-78℃、好ましくは-20~-40℃とし、その後室温にて攪拌することにより、0.5~36時間で反応が終了する。要すればカラムクロマトグラフィーを用いて精製することによりグルコース糖受容体にマンノース糖供与体が β -グリコシド結合した二糖(12)及び α -グリコシド結合した二糖(13)を得る。

【0030】化合物(12)は3~10当量の硝酸第二セリウムアンモニウム(CAN)と共にトルエン、アセトニトリル、水の混合溶媒中、4~50℃で0.5~6時間処理することにより、アノメリック位の保護基が脱離された二糖(14)へと導くことができる。トルエン、アセトニトリル、水の混合溶媒の組成比は、通常3:3:4が用いられるが、この組成比に限定されるものではない。

【0031】化合物(14)の還元末端の1位を活性化して、糖供与体(15)へと変換する反応は、通常の活性化反応により行うことができる。即ち、(14)にチオニクロライド、チオニプロマイド、DAST等のハロゲン化剤を反応させてグリコシルハライド(Cl 、 Br 、 F)へ、又は、DBU、水素化ナトリウム等の塩基の存在下トリクロロアセトニトリルを反応させて、トリクロロアセトイミデートに変換する。まず化合物(14)を塩化メチレン、クロロホルム、四塩化炭素等の溶媒に溶解し、これに氷冷下1~10倍モルのDASTを加えて反応を行う。5分~2時間で反応が終了したら、少量のメチルアルコールでDASTを不活性化し、酢酸エチルにより抽出して二糖性のグリコシルフルオリド(15)を得る。

【0032】三糖～五糖の合成は、糖の1位にアジド基を導入したグリコシルアジド(9)を糖受容体として、これに順次糖又は糖鎖を縮合させていくことにより行われる。この方法は従来全く知られていなかったものであり、この方法を用いれば糖鎖部分を自由にデザインすることができる。即ち、グリコシルアジド(9)と Cp_2HfCl_2 、 $AgClO_4$ などの活性化触媒、およびMS等の脱水剤を、塩化メチレン、クロロホルム、四塩化炭素等の溶媒に加えて攪拌する。これに $-10\sim-78^\circ C$ 、好ましくは $-20\sim-40^\circ C$ において、等モル～3倍モルのグリコシルフルオリド(15)を同溶媒に溶解して添加する。その後室温において6～36時間攪拌した後、反応液をセライトを通して濾過する。常法により後処理し、要すればカラムクロマトグラフィーにより精製して三糖(4')を得る。

【0033】化合物(4')の保護基 R^{1a} がアリル基の場合の脱離は、塩化パラジウム、ルテニウム錯体、イリジウム錯体等の触媒を用いて行う。例えばイリジウム錯体によるアリル基の脱離反応の場合、以下の通りである。まず、THF、ジオキサンなどの溶媒に化合物(4')を溶解し、これに1/5～1/20重量部のイリジウム錯体を添加して攪拌する。水素ガス気流下、溶液が無色になるまで攪拌した後、酢酸エチルを加えて濃縮する。残渣をアセトン・水混合溶媒(9:1)に溶解した後、 $HgCl_2/HgO$ 又は H_2O/I_2 を加えて1時間攪拌する。酢酸エチルにより抽出することによりアリル基の脱離された三糖(4)が得られる。

【0034】化合物(4)と(5)との縮合反応も、通常のグリコシル化反応に従って行うことができる。即ち、化合物(4)を塩化メチレン、クロロホルム、四塩化炭素等の溶剤に溶解し、これにシルバートリフレート($AgOTf$)などの触媒、及びMSなどの脱水剤を加えて室温で30分攪拌する。これを $-20\sim-78^\circ C$ 、好ましくは $-40^\circ C$ に冷却した後、同溶媒に溶解した2～10倍モルのマンノース糖供与体(5)を滴下する。反応温度を室温に戻し、12～36時間攪拌する。要すればカラムクロマトグラフィーを行い精製することにより、還元末端の糖1位にアジド基が導入された五糖性化合物(2)を得、所望により脱保護、アシル化等することにより化合物(2a)を得る。この五糖はアスパラギン結合型糖鎖に共通の母核構造を有する。

【0035】五糖(2)のアミノ基の保護基がフタロイル基の場合は、常法によりアミン類又はヒドラジンによって脱離する。即ち、化合物(2)をTHF、ジオキサン等の溶媒、あるいはn-ブタノール等のアルコールに溶解した後、これにエチレンジアミンなどのアミン類、あるいはメチルヒドラジン、ヒドラジン等のヒドラジン類を加えて攪拌する。TLCで反応を追跡し、要すればアルゴンガス気流下、 $50\sim100^\circ C$ 、あるいは溶媒の沸点まで加熱する。反応終了後、メタノールに溶解した

無水酢酸を加えて2時間攪拌後、溶媒を留去した後カラムクロマトグラフィーにより精製してアミノ基を有する五糖性化合物(2)を得る。

【0036】五糖性化合物(2a)とアスパラギン酸の無水物又は活性エステルとの反応は化合物(2a)のアジド基を還元してアミノ基に変換して五糖性グルコサミンを得る反応と、アスパラギン酸の無水物又は活性エステルとの縮合反応を同時に行う方法を採用した。即ち、 α -アミノ基及び α -カルボキシル基が保護されたアスパラギン酸(3)を塩化メチレン、あるいはクロロホルム、四塩化炭素等の溶媒に溶解し、氷冷下ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)を加えて30分攪拌すればアスパラギン酸無水物が得られる。また α -アミノ基及び α -カルボキシル基が保護されたアスパラギン酸とN-ヒドロキシマクシニイミドや1-ヒドロキシベンゾトリアゾールとを縮合剤の存在下に反応させれば、アスパラギン酸活性エステルが得られる。ここで用いる縮合剤としては、DCCの代わりに、N-エチル-N'-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド(EDC)や、ジイソプロピルカルボジイミド(DIPC)などの、通常ペプチド合成に用いられているカルボジイミドであれば何ら差し支えない。生じたN, N'-ジシクロヘキシル尿素(DCU)を濾過により取り除き、これにMS等の脱水剤、リンドラー(Lindlar)触媒及び五糖性化合物(2a)を加えた後、溶媒を留去する。残渣をメチルアルコールなどのアルコール類に溶解し、水素ガスによりアジド基の還元を行い、同時に生じたアミノ基とアスパラギン酸 β -カルボキシル基との縮合反応を行う。室温にて2～20時間攪拌後、濾過、濃縮、さらに要すればクロマトグラフィー処理を行うことにより本発明の五糖性のアスパラギン結合型糖誘導体(1)を得る。

【0037】アスパラギン結合型糖誘導体(1)を温和な酸処理、例えばトリフルオロ酢酸(TFA)で室温処理しトルエン共沸した後、モルホリン処理し、次いでPd-C及び酢酸存在下水素ガスを吹き込みつつ攪拌し、全ての保護基が脱離されたアスパラギン結合型糖誘導体を得ることができる。また R^1 、 R^2 、 R^{3a} 及び R^{4a} がそれぞれ異なる基である場合には、脱離反応条件を選択すれば、これらの基のうちで所望する基のみが脱離した化合物を得ることができる。

【0038】アスパラギン結合型糖誘導体(1)から高マンノース型糖鎖を合成するには、非還元末端側のマンノースの水酸基に適当に保護されたマンノオリゴ糖を適宜選択して結合すればよく、また、複合型糖鎖を合成するには、同じく保護されたラクトサミン誘導体を結合すればよい。ラクトサミン誘導体に適当に保護されたシアル酸あるいはフコースが結合していても、その場合の反応には全く問題がない。また、本発明のアスパラギン型糖誘導体(1)を用いて、固相法あるいは液相法によ

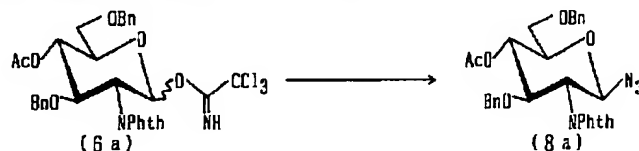
19

り、ペプチド鎖の伸長を容易に行うことができる。即ち、カルボキシル基の保護基をはずした後、既知の方法によりカルボキシル基を活性化し、それをペプチドのフリーのアミノ基と結合すれば、糖ペプチドが合成される。逆に、アミノ基の保護基をはずせば、その位置にカルボキシル基を活性化したアミノ酸あるいはペプチドを結合することもできる。この場合、カルボキシル基を固定化してペプチド鎖伸長反応を行うこともできる。即ち、固相法によるペプチド合成も可能である。従ってこの化合物を利用すれば、市販のペプチド合成機によるペ

【0039】以上に記述したように本発明のアスパラギン結合型糖誘導体(1)は、どのような構造のアスパラギン結合型糖鎖の合成にも対応できるのみならず、還元末端側にペプチド鎖を伸長することも可能である。従って本発明は、高マンノース型糖ペプチドあるいは複合型糖ペプチドを合成するための万能の合成中間体として有用である。

【0040】本発明のアスパラギン結合型糖誘導体(1)は、例えば下記の如き用途に使用し得る。

* 20



(式中、Acはアセチル基、Bnはベンジル基、Phthはフタルイミド基を示す。)

以下同じ)

【0045】MSAW300を一晩真空乾燥した。これにTMSN₃ 1g (8.7mmol)、塩化メチレン3ml、BF₃・Et₂O 12mg (0.08mmol)を加え、-78℃にて30分間攪拌した。これにトリクロロアセトイミデート体(6a) 600mg (0.89mmol)/塩化メチレン溶液(3ml)を滴下した。1時間後、フィルター濾過し、酢酸エチルにて抽出した。1N HCl、飽和NaCl水、飽和NaHCO₃水、飽和NaCl水で各々1回づつ洗浄後、有機層を無水硫酸マグネシウムにて乾燥した。溶媒を減圧除去した後、残渣をシリカゲルカラムにかけ、トルエン-酢酸エチル(8:1、v/v)で溶出し、化合物(8a)を得た。

【0046】収量 326mg
収率 65%

※Rf 0.44 (トルエン-酢酸エチル=3:1(v/v))

元素分析

	C	H	N
計算値	64.74	5.27	10.07
実測値	64.50	5.06	9.90

分子式 C₃₀H₃₀O₇N₄

分子量 化合物(2): 675.92

化合物(4): 556.57

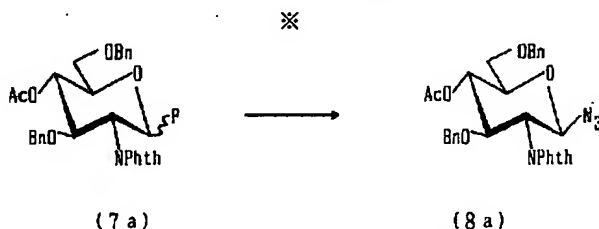
[α]_D²⁷ = +50.26° (C=1.006、クロロホルム)

FT-IR 2120.0cm⁻¹

【0047】実施例2

【0048】

【化17】



【0049】MS4A、AgClO₄ 51mg (0.24mmol)、Cp₂HfCl₂ 46mg (0.12mmol)を

真空乾燥した。これにTMSN₃ 62μl (0.47mmol)、塩化メチレン2mlを加え、30分間攪拌した。-

78℃に冷却した後、グリコシルフルオリド(7a) 50mg(0.094mmol)を加えた。30分後、フィルター濾過し、酢酸エチルにて抽出した。飽和NaCl水、飽和NaHCO₃水、飽和NaCl水で各々1回づつ洗浄後、有機層を無水硫酸マグネシウムにて乾燥した。溶媒を減圧除去し、残渣をシリカゲルカラムにかけ、トルエン-酢酸エチル(8:1、v/v)で溶出し、化合物*

* (8a)を得た。

【0050】収量 45mg

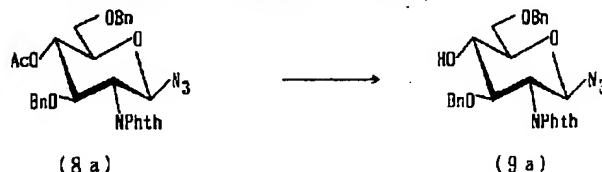
収率 86%

Rf 0.44 (トルエン-酢酸エチル=3:1(v/v))

【0051】実施例3

【0052】

【化18】



【0053】化合物(8a) 175mg(0.31mmol)をTHF 5mlに溶かし、氷冷下0.2N NaOMe/MeOHを1.5ml加えた。45分後、アンバーリスト15E(約100mg)にて中和した。アンバーリスト15Eを濾別し、濾液を減圧濃縮した。シリカゲルカラムにかけ、トルエン-酢酸エチル(5:1、v/v)で溶出し、化合物(9a)を得た。

※分子量 化合物(5): 514.54

[α]_D²⁵ = +15.8° (C=1、クロロホルム)

FT-IR 2118.1cm⁻¹ (N₃基)

【0055】実施例4

【0056】

【化19】

20

【0054】収量 145mg

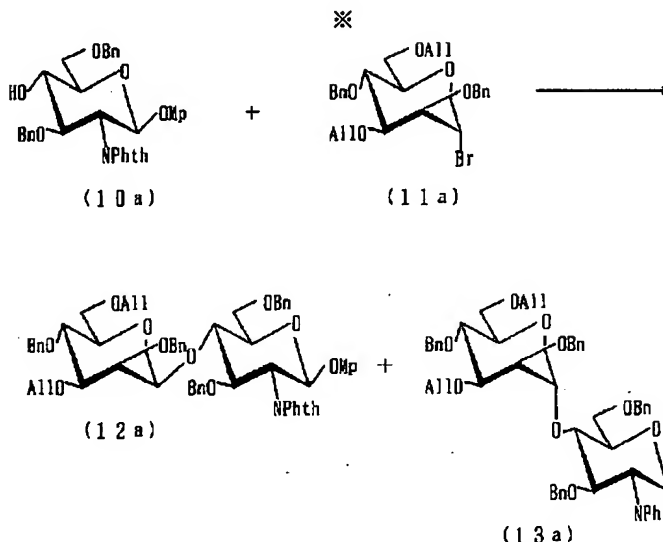
収率 90%

Rf 0.31 (トルエン-酢酸エチル=3:1(v/v))

元素分析

	C	H	N
計算値	65.36	5.09	10.89
実測値	65.10	5.10	10.77

分子式 C₂₈H₂₆O₆N₄



(式中、Allはアリル基を、Mpはメトキシフェニル基を示す。以下同じ)

【0057】乾燥MS4A、Agシリカーアルミナ(1.5g)、化合物(10a) 125mg(0.21mmol)を5mlの塩化メチレンに溶かし、-20℃にて攪拌した。塩化メチレン5mlに溶かした化合物(11a) 550mg(1.09mmol)を加えた後、室温にて一晩攪拌

した(12時間)。反応液をセライト濾過した後、酢酸エチルにて抽出した。飽和NaCl水、飽和NaHCO₃水、飽和NaCl水で各々1回づつ洗浄後、有機層を無水硫酸マグネシウムにて乾燥した。溶媒を減圧除去し、残渣をカラムクロマトにかけて精製して化合物(1

2 a) 及び化合物 (13 a) を得た。

【0058】

	化合物 (12a) β 体	化合物 (13a) α 体
収量	82mg	72mg
収率	38%	34%
Rf	0.33	0.46

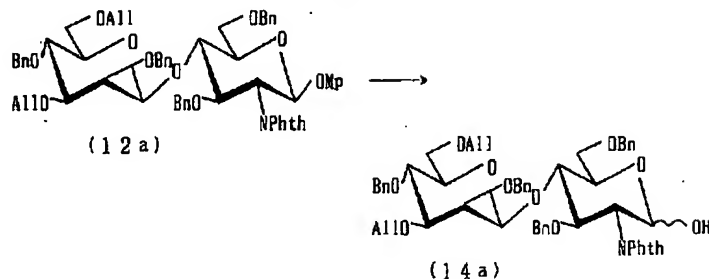
元素分析

	化合物 (12a) β 体			化合物 (13a) α 体		
	C	H	N	C	H	N
計算値	71.96	6.23	1.38	71.96	6.23	1.38
実測値	71.62	6.27	1.33	71.05	6.31	1.25

分子式 $C_{51}H_{53}O_{13}N$

分子量 化合物 (13a): 1018.15

【0059】実施例5



【0061】化合物 (12 a) 77mg (0.076mmol) をトルエン3mlに溶かし、これにアセトニトリル4mlを加えた。CAN 171mgを加えた後、水3mlを加え、室温で2時間攪拌した。酢酸エチルで希釈し、飽和NaCl水で2回洗浄後、飽和NaHCO₃水、飽和NaCl水で各々1回づつ洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムにて乾燥後、溶媒を減圧除去し、残渣をカラムクロマトにかけ、トルエン-酢酸エチル (3:1、v/v) で溶出して、化合物 (14 a) を得た。

【0062】収量 48mg

収率 70%

※Rf 0.19 (トルエン-酢酸エチル=3:1(v/v))

元素分析

	C	H	N
計算値	71.12	6.30	1.54
実測値	70.36	6.24	1.44

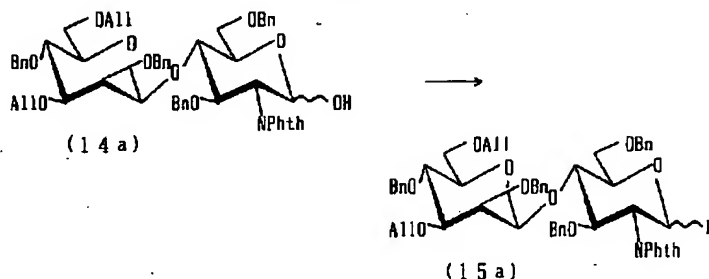
30 分子式 $C_{54}H_{57}O_{12}N$

分子量 化合物 (14a): 912.02

【0063】実施例6

【0064】

【化21】



【0065】化合物 (14 a) 48mg (0.053mmol) を塩化メチレン2mlに溶かし、氷冷下DAST 0.013mlを加えた。10分後メタノール0.1mlでDASTをつぶし、酢酸エチルにて抽出した。飽和NaCl水、飽和NaHCO₃水、飽和NaCl水で各々1回づつ洗浄後、有機層を無水硫酸マグネシウムにて乾燥

した。溶媒を減圧除去した後、残渣をカラムクロマトにかけ、トルエン-酢酸エチル (3:1、v/v) で溶出して化合物 (15 a) を得た。

【0066】収量 48mg (0.653mmol)

収率 100%

50 Rf 0.65 (トルエン-酢酸エチル=3:1(v/v))

元素分析

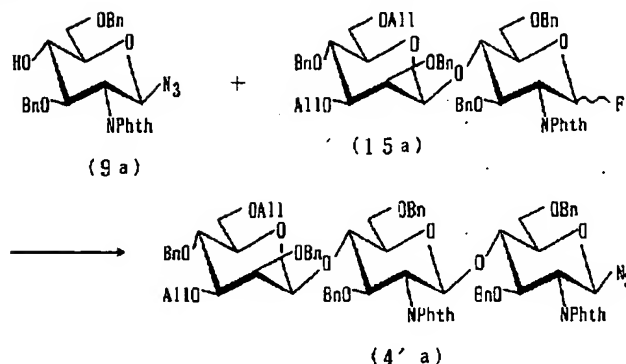
分子式 $C_{54}H_{56}O_{11}N_2$

分子量 化合物(15a): 914.02

* 【0067】実施例7

【0068】

* 【化22】



【0069】化合物(9a) 28mg (0.054mmol) と $AgClO_4$ 29mg, Cp_2HfCl_2 27mg, MS 4A を2mlの塩化メチレンに溶かして攪拌した。-20℃に冷却し、化合物(15a) 48mg (0.053mmol) を2mlの塩化メチレンに溶かした溶液を加えた。12時間後、反応液をセライト濾過し、濾液を酢酸エチルで希釈し、飽和 $NaHCO_3$ 水、飽和 $NaCl$ 水で各々1回づつ洗浄後、有機層を無水硫酸マグネシウムにて乾燥した。溶媒を減圧除去した後、残渣をバイオビーズSX-2にてゲル濾過して化合物(4'a)を得た。

【0070】収量 59mg (0.042mmol)

収率 79% (ドナーから計算)

Rf 0.57 (トルエン-酢酸エチル=3:1(v/v))

※ 元素分析

	C	H	N
計算値	69.52	5.77	4.74
実測値	69.92	5.79	4.97

分子式 $C_{84}H_{81}O_{19}N_3$

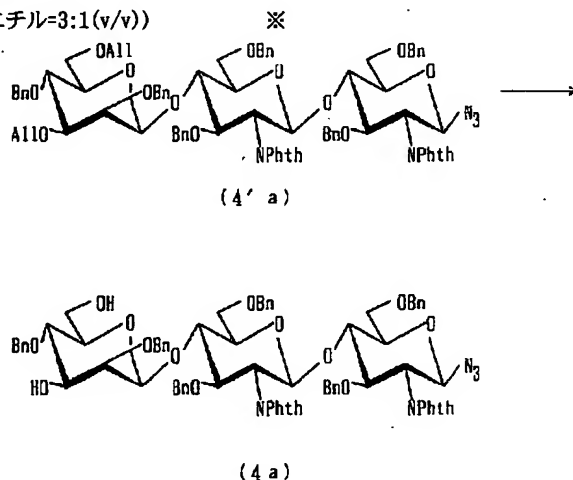
20 分子量 化合物(16a): 1408.54

【 α 】 $D^{25} = +4.5^\circ$ (C=1, クロロホルム)FT-IR $2116.2cm^{-1}$ (N₃基)

【0071】実施例8

【0072】

【化23】



【0073】イリジウム触媒 5mg を THF に加え攪拌し、水素雰囲気下とした。反応液が無色になったので、水素を除き、窒素置換した。1mlのTHFに化合物(4'a)を51mg (0.036mmol) 溶かし、イリジウム錯体溶液に加えた。1時間後、酢酸エチルで希釈し、減圧濃縮した。これをアセトン9mlに溶かし、水1mlを加えた後、 $HgCl_2$ 35mg, HgO 0.7mg を加えて攪拌した。1時間後、酢酸エチルで希釈し、飽和 $NaCl$ 水、飽和 $NaHCO_3$ 水、飽和 $NaCl$ 水で

洗浄後、シリカゲルカラムクロマトにかけてトルエン-酢酸エチル (3:1 (v/v)) で溶出して精製し、化合物(4a)を得た。

【0074】収量 48mg (0.036mmol)

収率 100%

Rf 0.1 (トルエン-酢酸エチル=3:1(v/v))

27

28

元素分析

	C	H	N
計算値	68.72	5.54	5.27
実測値	68.46	5.59	5.09

分子式 $C_{76}H_{73}O_{17}N_5$

分子量 化合物(4a): 1328.41

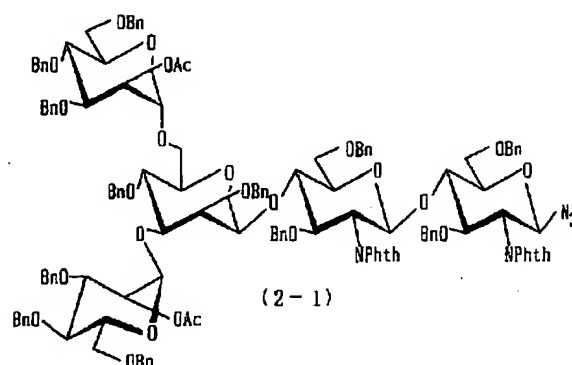
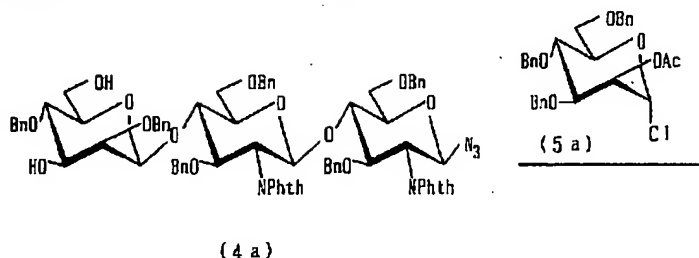
* $[\alpha]_D^{21} = +21.8^\circ$ (C=0.38、クロロホルム)

【0075】実施例9

【0076】

【化24】

*



【0077】化合物(4a) 112mg (0.084mmol) を10mlの塩化メチレンに溶かし、MS4A、AgOTf 153mg (0.59mmol) の中に加え、室温で30分間攪拌した。これを-40℃に冷却した後、化合物(5a) 172mg (0.034mmol) の塩化メチレン(2ml) 溶液を滴下した。反応溶液を室温に戻し、18時間攪拌した。セライト濾過後、濾液を濃縮し、パイオビーズSX-1でゲル濾過をした。更にシリカゲルカラム(溶離液、トルエン：酢酸エチル=7:1)にて精製し、化合物(2-1)を得た。

【0078】収量 154mg(0.068mmol)

収率 80%

Rf 0.56 (トルエン-酢酸エチル=2:1(v/v))

元素分析

	C	H	N
計算値	70.67	5.88	3.08
実測値	70.12	5.83	2.85

30

分子式 $C_{134}H_{133}O_{29}N_5$

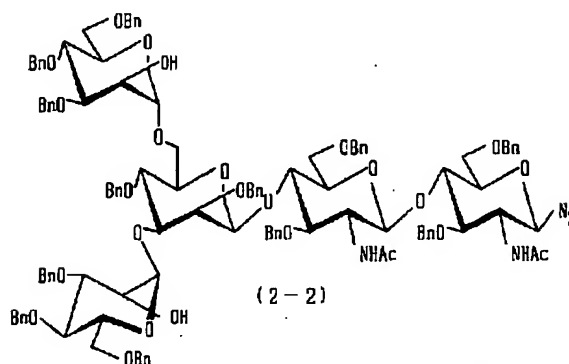
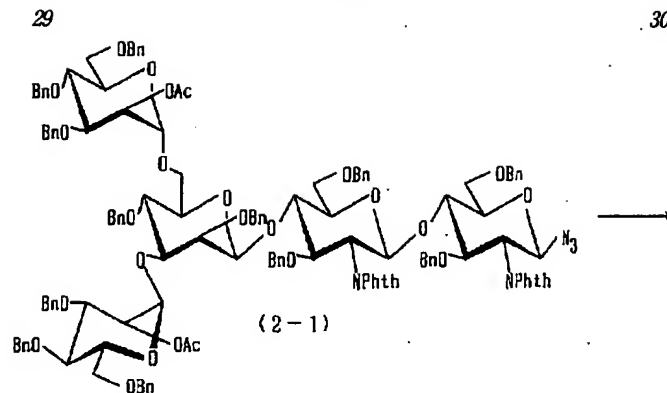
分子量 化合物(2-1): 2277.49

* $[\alpha]_D^{26} = +17.05^\circ$ (C=0.44、クロロホルム)

【0079】実施例10

【0080】

【化25】



【0081】化合物(2-1) 25mg (0.011mmol) をエチレンジアミン15mlとn-ブタノール8mlに溶かし、アルゴン雰囲気下、90℃にて16時間加熱した。溶媒を減圧除去した後、メタノールを加え、0℃に冷却した。これに無水酢酸を加え、2時間攪拌した。溶媒を減圧除去した後、PTLCにて精製し化合物(2-2)を得た(展開溶媒、クロロホルム：メタノール=20:1)。

【0082】収量 18mg(0.009mmol)

収率 80%

Rf 0.48 (クロロホルム：メタノール=20:1)

元素分析

	C	H	N
計算値	70.26	6.44	3.48
実測値	70.25	6.51	3.72

30 分子式 $C_{118}H_{29}O_{25}N_5$

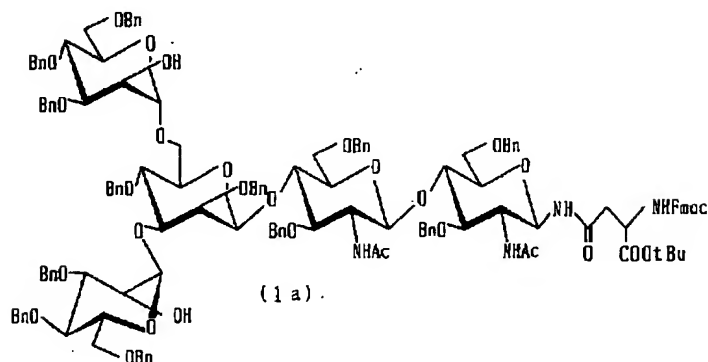
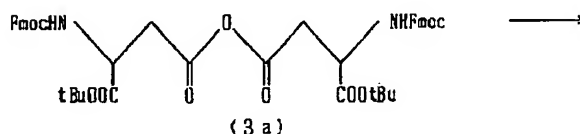
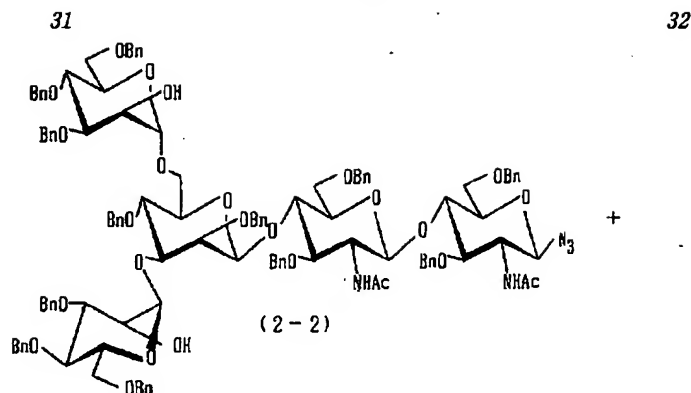
分子量 化合物(2-2): 2017.29

$[\alpha]_D^{27} = -8.9^\circ$ (C=1.007、クロロホルム)

【0083】実施例11

【0084】

【化26】



【0085】 α -アミノ基をFmoc基で、 α -カルボキシル基をt-Bu基でそれぞれ保護したアスパラギン酸20mgを塩化メチレン1mlに溶かし、氷冷下DCC5mgを加え、30分間攪拌した。メンブランフィルターにてDCUreaを濾別し、濾液を濃縮し、化合物(3a)を得た。これにMS3Aとリンドライ触媒13mgを加え、更に化合物(2-2)17mgを1mlの CH_2Cl_2 に溶かした溶液を加えた。減圧下 CH_2Cl_2 を除きメタノール5mlを加えた後、水素ガス雰囲気下とした。5時間後フィルター濾過し、濾液を濃縮後セファデックスLH-20にてゲル濾過してアスパラギン結合型糖誘導体(1a)を得た。

【0086】収量 16mg

収率 79%

30 Rf 0.72 (クロロホルム:メタノール=10:1)

元素分析

	C	H	N
計算値	71.02	6.51	2.35
実測値	71.28	6.63	2.15

分子式 $\text{C}_{141}\text{H}_{34}\text{O}_{30}\text{N}_4$

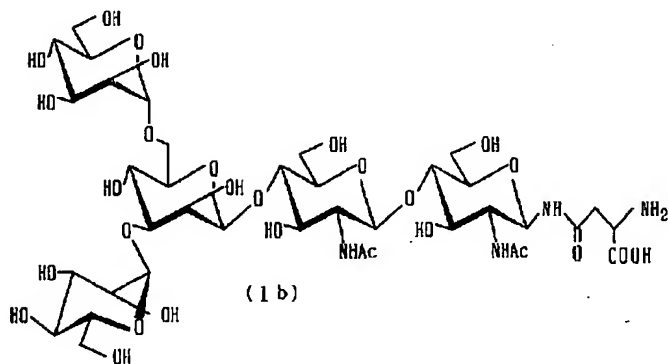
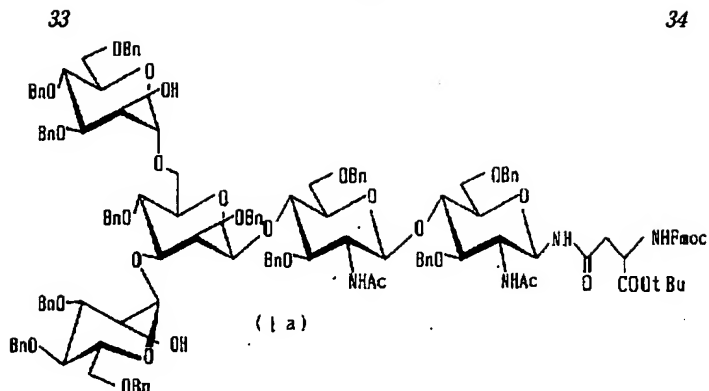
分子量 化合物(1a): 2384.72

$[\alpha]_D^{25} = +9.02$ (C=0.82、クロロホルム)

【0087】実施例12

【0088】

40 【化27】



【0089】化合物 (1 a) 9 mg (3×10^{-3} mmol) を、TFA 1 ml に溶かし、室温で 40 分間攪拌した。TFA を減圧除去し、トルエンで 2 回共沸した。モルホリン 1 ml を加え、室温で 1 時間攪拌した後、モルホリンを除去し、セファデックス LH-20 (メタノール) でゲル濾過後、水/酢酸 = 1/4 5 ml に溶かし、Pd-C 触媒 20 mg を加え、水素ガス雰囲気下、19 時間攪拌した。触媒をメンブレンフィルターで除き、濾液を濃縮後、バイオゲル P-2 でゲル濾過して化合物 (1 b) を得た。

【0090】収量 3mg

収率 79%

Rf 0.22 (n-ブタノール:メタノール:水:酢酸=4:2:2:1)

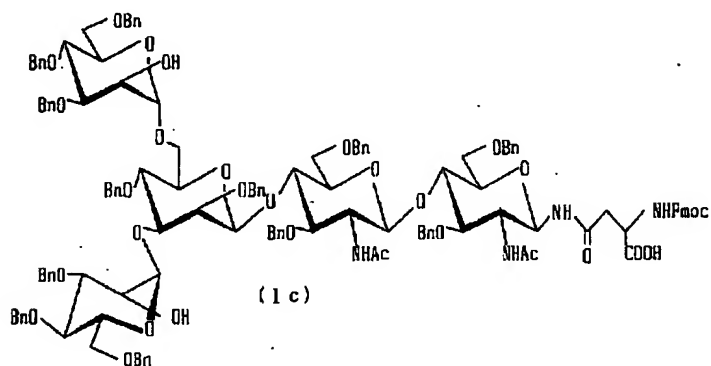
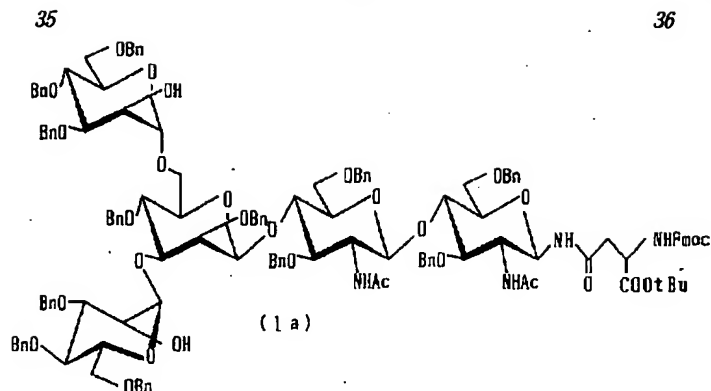
分子式 $C_{38}H_{54}O_{28}N_4$

分子量 化合物 (1b): 1024.906

【0091】実施例 13

【0092】

【化28】



【0093】化合物(1a) 18mg (0.0075mmol) を塩化メチレン1ml、TFA 0.5mlに溶かし、室温下撹拌した。1時間後、溶媒を減圧除去し、ODSカラムを用いたHPLC (溶離溶媒: 0.1%TFA/C₆H₅CN 0.1%/TFA/H₂O) にて化合物(1

【0094】収量 15.6mg(0.0067mmol)
収率 89%

Rf 0.33 (クロロホルム:メタノール=10:1、0.1%酢酸)

分子式 C₁₃₇H₁₄₆O₃₀N₄

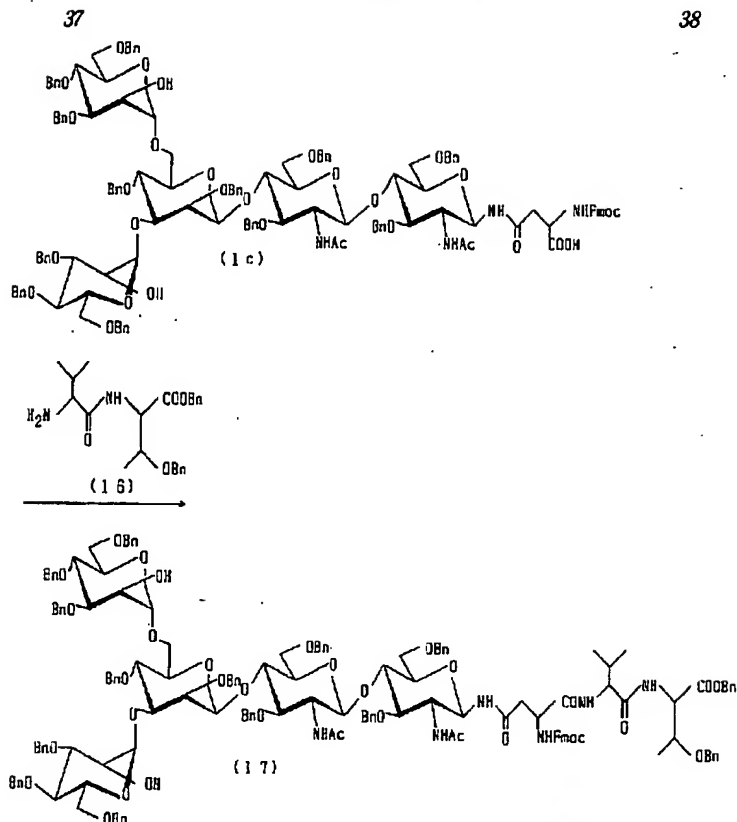
分子量 化合物(1c): 2328.62

【α】_D²⁵ = +10.39° (C=0.51/mg/ml、クロロホルム)

【0095】実施例14

【0096】

【化29】



【0097】化合物(1c) 8mg (0.0034mmol) と化合物(16) 2.5mg (0.0062mmol) を1ml の塩化メチレンに溶かした。これにHOBt 1.8mg (0.01mmol)、EDC 2.4mg (0.01mmol) を加え、室温で30分間攪拌した。反応液をそのままセファデックスLH-20によりゲル濾過して化合物(17)を得た。

【0098】収量 9.2mg (0.032mmol)

収率 90%

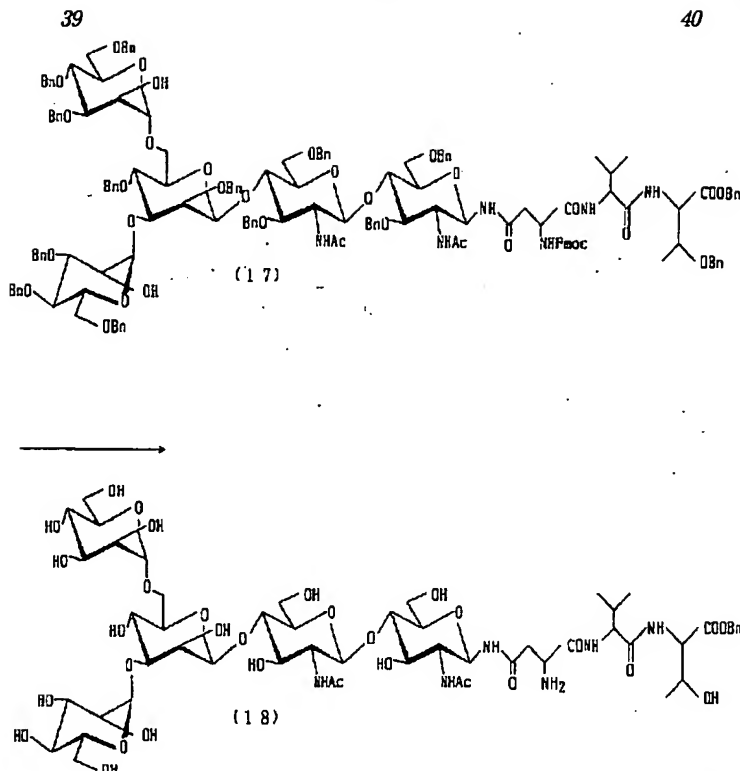
Rf 0.33 (トルエン:エタノール=3:1)

$[\alpha]_D^{27} = -3.75^\circ$ (C=0.24、クロロホルム)

【0099】実施例15

【0100】

30 【化30】



【0101】化合物(17) 9mg (0.0031mmol) をモルホリン 1ml に溶かし、室温で1時間攪拌した。減圧下モルホリンを除去し、トルエンで2回共沸した。これをメタノール/水(10/1)に溶かし、ヘキサンを加えた。ヘキサン層を除去し、メタノール/水層を濃縮した。これをメタノールに溶かし、セファデックス LH-20 にてゲル濾過した。得られた脱 Fmoc 体 (Rf = 0.63、トルエン/エタノール = 7/2) を酢酸/水(4/1) 10ml に溶かし、Pd-C 触媒 29mg を加えた後、水素ガス雰囲気とした。19時間後、Pd-C 触媒をセライトにて濾別し、濾液を濃縮後、バイオゲル P-2 にてゲル濾過しアスパラギン結合型糖ペプチド誘

導体(18)を得た。この糖ペプチドは、hCG ホルモンの α サブユニットのアミノ酸配列に含まれるものである(52番目のアスパラギン残基)。

【0102】収量 2.2mg

収率 58%

Rf 0.26 (n-BuOH:メタノール:水:酢酸=5:2:2:1)

【0103】

30 【発明の効果】本発明のアスパラギン結合型糖誘導体(1)は、どのような構造のアスパラギン結合型糖鎖の合成にも対応できるのみならず、不溶性の樹脂上でペプチド鎖を伸長させていくペプチド固相合成法に組み入れ、更に大きな糖ペプチドにすることも容易である。

フロントページの続き

(72)発明者 小川 智也

埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所
内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.